

PREPARATION OF ERYTHROPOIETIN-PRODUCING CELL**Publication number:** JP62198388 (A)**Publication date:** 1987-09-02**Inventor(s):** UEDA MASAJI; AKAI KUNIHISA; MURAKAMI MASAHIKO;
CHIBA HIDEO; SASAKI RYUZO +**Applicant(s):** SNOW BRAND MILK PROD CO LTD +**Classification:****- international:** C07K14/505; C12N15/00; C12N15/09; C12N15/85; C12N5/00;
C12N5/10; C12P21/00; C12P21/02; C12R1/91; C07K14/435;
C12N15/00; C12N15/09; C12N15/85; C12N5/00; C12N5/10;
C12P21/00; C12P21/02; (IPC1-7): C12N15/00; C12N5/00;
C12P21/00; C12R1/91**- European:** C07K14/505; C12N15/85**Application number:** JP19860042275 19860227**Priority number(s):** JP19860042275 19860227**Also published as:**

JP6102035 (B)

JP1967994 (C)

Abstract of JP 62198388 (A)

PURPOSE: To prepare an erythropoietin-producing cell, by introducing a mixed vector of an erythropoietin transducing vector and selected marker gene transduced vector into a mouse L929 cell using a specific technique. CONSTITUTION: An aminoglycoside 3'-phosphotransferase gene (neo gene) derived from Tn which is a selected marker is inserted into the downstream of SV40 early gene of a shuttle vector pKSV-10 to prepare a selected marker neo-<r> gene transduced vector pKSVNeo, which is then mixed with an erythropoietin transducing vector pSVHEPX. The resultant mixed vector is further introduced into a mouse L929 cell by a DNA transfection technique using calcium phosphate to prepare the aimed erythropoietin-producing cell.

.....
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

⑱ 公開特許公報 (A) 昭62-198388

⑯Int.Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	⑳公開 昭和62年(1987)9月2日
C 12 N 5/00		7115-4B	
15/00		7115-4B	
// C 12 P 21/00		6712-4B	
(C 12 N 5/00			
C 12 R 11:91)			
		審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)	

⑲発明の名称 エリスロボエチン産生細胞の作成方法

⑳特願 昭61-42275

㉑出願 昭61(1986)2月27日

㉒発明者 上田 正次 川越市今福1672の1の719
 ㉒発明者 赤井 邦久 宇都宮市東宿郷3-4-7 政邦コーポ304
 ㉒発明者 村上 晶彦 宇都宮市東宿郷3-4-7 政邦コーポ305
 ㉒発明者 千葉 英雄 宇治市広野町新成田100-131
 ㉒発明者 佐々木 隆造 京都市左京区田中高原町14
 ㉑出願人 雪印乳業株式会社 札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
 ㉑代理人 弁理士 宮田 広豊

明細書

方法。

1. 発明の名称

エリスロボエチン産生細胞の作成方法

2. 特許請求の範囲

(1) エリスロボエチン遺伝子を哺乳動物細胞用シャトルベクター-pKSV-10 のSV40初期遺伝子プロモーターの下流に挿入することによりエリスロボエチンの形質導入ベクター-pSVhEPX を作成し、一方選択マーカーのTn由来のアミノグリコシド3'-ホスホトランスクエラーゼ遺伝子(neo遺伝子)をシャトルベクター-pKSV-10 のSV40初期遺伝子の下流に挿入することにより選択マーカーneo^r 遺伝子導入ベクター-pKSVNeo を作成し、得られたエリスロボエチンの形質導入ベクター-pSVhEPX と選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクター-pKSVNeo を混合したベクターを、リン酸カルシウムを用いるDNAトランスクエクションの手法により、マウスL929細胞へ導入することを特徴とするエリスロボエチン産生細胞の作成

(2) エリスロボエチン遺伝子は、全エリスロボエチンゲノム遺伝子を、プラスミドpUC8の制限酵素EcoRI 及びSmaIによる切断部位に挿入したプラスミドpEP1425を用いて制限酵素 BglII 及びBamHI で切断して分離したものである特許請求の範囲第(1)項記載の作成方法。

(3) エリスロボエチンの形質導入ベクター-pSVhEPX の作成を、エリスロボエチン遺伝子をシャトルベクター-pKSV-10 の制限酵素 BglII による切断部位に挿入した後、上記シャトルベクター-pKSV-10 のSV40の初期遺伝子プロモーターの下流にエリスロボエチン遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して行なうものである特許請求の範囲第(1)項記載の作成方法。

(4) 選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクター-pKSV Neoの作成を、選択マーカー neo^r 遺伝子を含有するプラスミドpNEOを制限酵素HindIIIで切断した後、Klenow酵素で 5' 突起部位を修復し、

次いで BamHI リンカーを接続した後、制限酵素 BamHI で切断した neo 遺伝子断片を、シャトルベクター pKSV-10 の制限酵素 BglII による切断部位に挿入し、上記シャトルベクター pKSV-10 の SV40 の初期遺伝子プロモーターの下流に neo 遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図分析により選択して行なうものである特許請求の範囲第(I)項記載の作成方法。

(5) エリスロポエチンの形質導入ベクター-pSVhEPX と選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクター-pKSV Neo を 10:1 の割合で混合する特許請求の範囲第(I)項記載の作成方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、造血因子、すなわち、赤血球生成促進因子であるエリスロポエチン（ヒト・エリスロポエチン）の産生能を有する動物細胞の作成方法に関する。

従来の技術的背景

赤血球産生の亢進効果が確認されている [Masunaga H. et al. 「Acta Hematal Jpn in press」 (アクタ ヒマトロジイ ジャパン インプレス)]。

したがつて、エリスロポエチンは、臨床上の応用として腎疾患者の貧血治療、腎摘出後の血液透析患者の貧血防止、手術後患者の赤血球産生増進による回復促進等への適応が可能な医薬に用いられる。

而して、エリスロポエチンは、上述のように臨床上貧血治療への応用が期待されるものの、医薬としての高純物のものを大量に供給することが困難であるため、医薬品として開発は遅れているのが現状である。すなわち、エリスロポエチンは再生不良性貧血患者の尿中に含まれていることから、従来は、該尿から分離、採取して精製したものを試験研究に用いられるにすぎなかつた。

このような状況に鑑み、本発明者等は、最近エリスロポエチンで免疫した実験動物の脾臓細胞とミエローマ細胞とを細胞融合させたハイブリドー

エリスロポエチンは、骨髓に存在する赤血球系前駆細胞 (CFU-E) に作用して、赤血球細胞への分化を促進する赤血球生成促進因子であつて、ヒト・エリスロポエチンの物性は下記のとおり報告されている。

ヒト・エリスロポエチンは、分子量 35,000 を有する糖タンパク質であつて、[Yanagawa S. et al. 「J. Biol. Chem.」 (ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー) 、 259, 2707-2710 (1984)]、そのペプチド部分は 166 個のアミノ酸より成る 1 本鎖ポリペプチドである [Jacob K. et al. 「Nature」 (ネーチャ) 、 313, 806-810 (1985)] とそれぞれ報告されている。

また、ヒト・エリスロポエチンの cDNA 及びゲノム DNA の構造も上記 Jacob K. 等の報告にみられるとおり明らかにされている。

また、エリスロポエチンの臨床的効用については、貧血患者の尿より採取して純化した標品を用いての動物実験に基づいて、エリスロポエチンの

マより得られるモノクローナル抗エリスロポエチン抗体を結合した吸着剤を用いることにより、貧血患者尿から純粋なエリスロポエチンを高収率で製造する方法を開発した (特開昭60-41614号)。

しかし、上記方法によるも原料としての上記尿の供給が制限されるため、エリスロポエチンを大量に生産して医薬として定常的に供給することは困難とされる。

したがつて、エリスロポエチンを貧血治療用医薬とするには遺伝子工学的手法を利用した技術を確立する必要があると考えられている。

発明が解決しようとする問題点

本発明者は、エリスロポエチン生産上の上述した問題点に鑑みなされたものであつて、遺伝子工学的手法を利用することによりエリスロポエチン生産細胞を作成する方法を提供することを目的とする。

すなわち、本発明は、貧血患者尿を原料としてエリスロポエチンを製造する従来法の問題点であ

つた原料上の制約を解消して、エリスロポエチンを大量生産方式で製造することを可能とするものである。

本発明者は、エリスロポエチン遺伝子を、特別に作成したベクターを介してマウスL929細胞へ導入することにより、エリスロポエチンを恒常に产生する細胞を作成することに成功し、本発明をなすに至つた。以下本発明を詳しく説明する。

発明の構成

本発明に係るエリスロポエチン產生細胞の作成方法の特徴は、エリスロポエチン遺伝子を、哺乳動物細胞用シャトルベクター-pKSV-10 の SV40 初期遺伝子プロモーターの下流に挿入することによりエリスロポエチンの形質導入ベクター-pSVhEPX を作成し、一方選択マーカーの Tn 由来のアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo 遺伝子) をシャトルベクター-pKSV-10 の SV40 初期遺伝子の下流に挿入することにより選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクター-pKSVNeo を作成し、得

挿入したプラスミド phEP 1425 を用い、該プラスミド phEP 1425 を制限酵素 Bgl II 及び Bam HI で切断してエリスロポエチン遺伝子を分離し、該エリスロポエチン遺伝子を、哺乳動物細胞用のシャトルベクター-pKSV-10 の制限酵素 Bgl II による切断部位に挿入した後、該シャトルベクター-pKSV-10 の SV40 の初期遺伝子プロモーターの下流にエリスロポエチン遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して得られたものをエリスロポエチン形質導入ベクターとする。なお、本ベクターの動物細胞におけるエリスロポエチン遺伝子の発現は、COS 細胞におけるトランジェントエクスプレッションにより確認し得る。

選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクターの作成：

選択マーカー neo^r 遺伝子を含有するプラスミド pNEO を制限酵素 $Hind$ III で切断した後、Klenow 酶素 (DNA ポリメラーゼ I) で 5' 突起を修復し、次いで Bam HI リンカーを接続した後、制限酵素 Bam HI で切断した neo 遺伝子 (1946 bp) 断片を

られたエリスロポエチン形質導入ベクター-pSVhEPX と選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクター-pKSVNeo を混合したベクターを、リン酸カルシウムを用いる DNA トランスフェクションの手法によりマウス L929 細胞へ導入することにある。

すなわち、本発明は、エリスロポエチン遺伝子導入ベクターと選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクターをそれぞれ作成し得られた両ベクターのコートransfekション手法により、エリスロポエチン遺伝子を L-929 細胞へ導入してエリスロポエチン產生細胞を取得するものである。

問題点を解決するための手段

本発明では、まず、下記手順に従つてエリスロポエチン形質導入ベクターと選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクターをそれぞれ作成する。

エリスロポエチン形質導入ベクターの作成：

ヒト・ゲノム DNA ライブラリーから入手した全エリスロポエチンゲノム遺伝子を、プラスミド PUC 8 の制限酵素 Eco RI と Sma I による切断部位に

シャトルベクター-pKSV-10 の Bgl II による切断部位に挿入して、該シャトルベクター-pKSV-10 の SV40 の初期遺伝子プロモーターの下流に neo 遺伝子が正しく挿入されたものを制限酵素地図解析により選択して得られたものを選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクターとする。

なお、本ベクターの動物細胞における neo 遺伝子の発現は、L929 細胞への neo 遺伝子の形質導入を行ない、G418 耐性細胞の生成により確認し得る。エリスロポエチン遺伝子の L929 細胞への導入：

本発明では、次いで上述のようにして作成したエリスロポエチン形質導入ベクターと選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクターとを混合したベクターをリン酸カルシウムを用いる DNA トランスフェクション手法 (コートransfekション法) によりマウス L929 細胞へエリスロポエチン遺伝子を導入する。上記ベクターの混合はエリスロポエチン形質導入ベクターと選択マーカー neo 遺伝子導入ベクターを 10:1 の割合で行なうのが好ましい。

エリスロポエチン産生細胞の作成:

上述のようにしてエリスロポエチン遺伝子を導入したL929細胞は上記トランスフェクションの3日後に約6倍に希釈して培地に接種して培養し、接種の翌日以降G418を培養液に添加して2週間培養を行ない、G418耐性細胞（選択マーカー形質導入細胞）を選択した後、培養液中にエリスロポエチンを放出している細胞を選択した。次いで、この選択細胞について限界希釈法でエリスロポエチン遺伝子を発現している細胞をクローニングした後、上記発現の高いものを選択し、1ヶ月間継代培養を行ない、エリスロポエチンを恒常に生産する細胞株L-929-SVhEPを樹立する。

なお、上記細胞株により産出されるエリスロポエチンはラジオイムノアッセイ法及びマウス胎児肝細胞を用いたin vitroバイオアッセイ法により確認し得る。以下に実施例を示して本発明を更に具体的に説明する。

水層を集め、1回のエタノール抽出、3回のエーテル抽出により水層に含まれるエタノールを除去した後、2倍量のエタノールを加え、DNA断片を沈殿させた。DNA断片（沈殿）を遠心により回収し、DNAを乾燥させた後10μlの滅菌水に溶解し、エリスロポエチン遺伝子溶液とした。

一方、シャトルベクターpKSV-10 2μg(4μlのTE緩衝液に溶解)に5倍濃度のBglII反応緩衝液及びBglII 10単位を加え、37℃ 1時間反応をさせ、簡便した。この反応液をエタノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈殿1回の処理を行い、DNAを乾燥させた後、10μlのTE緩衝液に溶解し、10μlの5倍濃度CIP反応緩衝液(250mM Tris-HCl、5mM MgCl₂、0.5mM ZnCl₂、5mM spermidine pH 9.0)、28μlの滅菌水、24単位のCIP(calf intestinal alkaline phosphatase)を加え、37℃ 30分反応させた。その後、さらに24単位のCIPを加え、37℃で30分間反応させ2回のエタノール抽出、3回のエーテル抽出、1回のエ

実施例1

エリスロポエチン形質導入ベクター(pSVhEPX)の作成

58μlのTE緩衝液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA pH 7.4)に溶解したプラスミドphEP 1425(プラスミドpUC 8のEcoRI、SmaI切断部位にエリスロポエチンゲノム遺伝子を挿入したもの；大きさ5.3 kb)4μgに対し、5倍濃度のBglII反応緩衝液(50mM Tris-HCl、35mM MgCl₂、500mM NaCl、35mMメルカプトエタノール)20μlを加えた後、各10単位の制限酵素BglII及びBamHIを加え、37℃で2時間反応した後、3.5%ボリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、2.6kbのBglII-BamHI断片(エリスロポエチン遺伝子)に相当するゲルの部位を切り出し、ゲルを微細に破碎した後、溶出用緩衝液(0.5M 酢酸アンモニウム、1mM EDTA、0.1% SDS pH 8.0)を0.5ml加え、37℃で1晩インキュベートし、DNAの抽出を行つた。DNAは遠心によりアクリルアミドゲルを沈降させ、上層の

タノール沈殿の処理を行い、DNAを乾燥し、10μlの滅菌水に溶解してBglII切断CIP処理pKSV-10溶液とした。

100ng(ナノグラム10⁻⁹g)のBglII切断CIP処理pKSV-10(2μlの水に溶解)に、100ngのエリスロポエチン遺伝子(8μlの水に溶解)、1μlの10倍濃度ligation反応緩衝液(660mM Tris-HCl、66mM MgCl₂、100mM DTT、pH 7.6)、1μlの9mM ATP及び1.5μlのT4 DNA ligase(4.2単位)を加え(最終DNA末端濃度10.9 pmol/ml)4℃で1晩反応を行つた。反応液を2回エタノール抽出、3回エーテル抽出、1回のエタノール沈殿の処理を行つたのち、DNAを乾燥させ20μlのTE緩衝液に溶解して、形質転換用DNA溶液とした。そのDNA溶液10μlを用いて200μlの大腸菌DH-1コンピテント(competent)細胞を形質転換した。用いたDH-1コンピテント細胞の形質転換頻度はpBR 322 DNA 1μgあたり1.0×10⁴個であつた。以上の操作により46株の

アンビシリソ耐性形質転換株を得た。うち、16株について、プラスミドの制限酵素切断地図解析を行い、目的とするエリスロポエチソ形質導入ベクターを有する3株を選択した。さらに、うち1株を用いて常法に従いプラスミド調製を行いエリスロポエチソ形質導入ベクター(pSVhEPX)を調製した。尚、本ベクターの動物細胞におけるエリスロポエチソ遺伝子の発現は、COS細胞を用いるトランジエントエクスプレッションを行うことにより確認した。

選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクターの作成

10 μl の TE-緩衝液に溶解した 2.5 μg のプラスミド pNEO に対し、10倍濃度の *Klenow* III 反応緩衝液(100mM Tris-HCl、100mM MgCl₂、500mM NaCl、10mM DTT、pH 7.5) 10 μl、滅菌水 76 μl を加えた後、50単位の *Klenow* III を加え、37℃で2時間反応した後、1回エタノール抽出、3回エーテル抽出、エタノール沈殿1回の処理を行い、DNAを乾燥させた後、50 μl の滅菌水に溶解した。本溶

液に10倍濃度の *Klenow* 反応緩衝液(500mM Tris-HCl、100mM MgSO₄、1mM DTT、500 μg/ml BSA)、25 μl の 2mM dNTP(dATP、dGTP、dTTP、dCTP の混合液)、滅菌水 113 μl および10単位の *Klenow* 酵素(DNA polymerase I large fragment)を加え、22℃で30分間反応を行い、5'末端突起部位の修復を行つた。エタノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈殿1回の処理を行い、DNAを乾燥させ、10 μl の滅菌水に溶解した。次に、3 μg の *Bam*Hリシンカー[d(pCGGATCCG)]、1 μl の水に溶解)、10倍濃度の ligation 反応緩衝液 3 μl、滅菌水 16 μl 及び 4 μl の T4-DNA ligase(II.2 単位)を加え、22℃ 6 時間の反応を行つた。エタノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈殿1回の処理の後、DNAを乾燥させ、80 μl の滅菌水に溶解し、5倍濃度の *Bgl*I 反応緩衝液 20 μl、50単位の *Bam*Hを加えて、37℃で3時間の反応を行つた。本反応液を 3.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことに

より DNA 断片を分離し、1496 bp の neo 遺伝子に相当するゲルの部位を切り出し、ゲルを微細に破碎した後溶出用緩衝液 400 μl を加え、37℃で1晩の抽出を行つた。遠心によりアクリルアミドゲルと水層とに分け、水層をエタノール抽出1回、エーテル抽出3回、エタノール沈殿1回を行いDNAを精製した。

50ng の neo 遺伝子(19 μl の水に溶解)と、110 μg の *Bgl* II 切断 CIP 处理 pKSV-10(4 μl の水に溶解)に10倍濃度の ligation 反応緩衝液 3 μl、9mM ATP 溶液 1.2 μl 及び 2 μl の T4-DNA ligase(5.6 単位)を加え 4℃ 1晩の反応を行つた。

反応液を2回エタノール抽出、3回エーテル抽出、1回のエタノール沈殿の処理を行つたのち、DNAを乾燥させ、20 μl の TE-緩衝液に溶解し、形質転換用 DNA 溶液とした。その溶液 5 μl を用いて 200 μl の大腸菌 DH-1 コンピテント細胞に形質転換した。

(形質転換頻度 3 × 10⁶ 個 / μg pBR322)。以上の操作により21株のアンビシリソーカナマイシン耐性形質転換株を得た。うち11株についてプラスミドの制限酵素切断地図解析を行い、正確な方向に neo 遺伝子の挿入された選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクターを有する4株を選択した。さらに、うち1株を用いて、常法に従いプラスミド調製を行い選択マーカー neo^r 遺伝子導入ベクター(pKSV Neo)を調製した。尚本ベクターの動物細胞における neo 遺伝子の発現は L-929 細胞への neo 遺伝子の形質導入を行い、G-418 耐性細胞の生成により確認した。

L-929 細胞へのエリスロポエチソ遺伝子の導入
2 × 10⁶ 個のマウス L-929 細胞を 25cm²-フラスコに播種し、翌日、リン酸カルシウム法による DNA トランスクエクションを行つた。トランスクエクションは、エリスロポエチソ形質導入ベクター-pSVhEPX 及び選択マーカー neo^r 形質導入ベクター-pSV Neo を用いたコトランスクエクション法

により行つた。すなわち、 $2.5\ \mu\text{g}$ の環状pSV Neo 及び $22.5\ \mu\text{g}$ の環状 pSVhEPXを $22\ \mu\text{l}$ の TE-緩衝液(pH 7.5)に溶解し、 $500\ \mu\text{l}$ の isotonic HEPES Saline(137mM NaCl、5mM KCl、0.7mM リン酸2ナトリウム、6mM グルコース、21mM HEPES)を加えた後、 $33.3\ \mu\text{l}$ の2M塩化カルシウム液を徐々に攪拌しながら滴下後、20分間室温に放置しDNA-リン酸カルシウム液を調製した。

先に調製した L-929細胞の培養液(Eagle's MEM (Earle's salt) + 10% FCS)を取り除き、DNA-リン酸カルシウム液 $500\ \mu\text{l}$ を加え室温で20分間放置後 $4\ \mu\text{l}$ $150\ \mu\text{M}$ のクロロキンを含む培養液を加え、4時間 CO_2 インキュベーター内でインキュベーション後、培養液で洗浄した後、15%グリセロールを含む isotonic HEPES Saline 2mLを加え室温で3分間インキュベートし、培養液で洗浄後、新たに $4\ \mu\text{l}$ の培養液を加え培養した。2日後、 80cm^2 T-フラスコ 2本に播種しなおした(1/6 split)。翌日、 $400\ \mu\text{g}/\text{mL}$ の G 418を含む培養液に取り換

え、適時メジウム交換を行い、G 418 耐性細胞を選択した結果、13日後に G 418耐性株 7株を得た。3日後、96穴マイクロウェル 1枚に50個の細胞を播種する限界希釈法を行い、適時 G 418 $400\ \mu\text{g}/\text{mL}$ を含む培養液を取り替え、16日後に45ウェルにコロニーを見出した。これら45ウェル中の培養上清に含まれるエリスロポエチニ活性をラジオイムノアッセイ法により調べた結果、38ウェルに活性を見出した。そのうち、高いエリスロポエチニ量を示した 6ウェルの細胞を選出し、G 418 含有下で増殖を行い、再度同様にして限界希釈を行いエリスロポエチニを恒常的に生産する細胞株を樹立し、L-929 SVhEP 001 と命名した。尚、L-929 SVhEP 001 のエリスロポエチニ生産量をラジオイムノアッセイ法及びマウス胎児肝細胞を用い、CFU-E 形成を行う in vitro バイオアッセイ法で調べた結果、両者は同一の活性を示し、100単位/ $10^6\ \text{cell/day}$ であつた。

実施例 2

本例では、鎖状の形質導入ベクターを用いた L-929 へのエリスロポエチニ遺伝子の導入の態様を示す。

エリスロポエチニ形質導入ベクター - pSVhEPX 及び選択マーク - neo^r 遺伝子導入ベクターは、実施例 1 で作成したものを使用した。

鎖状形質導入ベクターの作成

$2.5\ \mu\text{g}$ の pKSV Neo($2.1\ \mu\text{l}$ の TE緩衝液に溶解) 及び $22.5\ \mu\text{g}$ の pSVhEPX ($19.8\ \mu\text{l}$ の TE緩衝液に溶解) に 2倍濃度の EcoRI反応緩衝液(100mM Tris-HCl、14mM MgCl₂、200mM NaCl、14mM 2-メルカプトエタノール、0.02% BSA) $110\ \mu\text{l}$ 、滅菌水 $68\ \mu\text{l}$ 及び EcoRI $5\ \mu\text{l}$ (100単位) を加え、37℃で2時間反応させた後、フェノール抽出 1回、エーテル抽出 3回、エタノール沈殿 1回の処理を行い、DNAを乾燥させた後、 $22\ \mu\text{l}$ の TE-緩衝液に溶解し、DNA溶液とした。

L-929 細胞へのエリスロポエチニ遺伝子の導入

実施例 1 に記載したと同様な手順で行つた。す

なわち、 2×10^6 個のマウス L-929細胞をDNAトランスフェクションの前日に 25cm^2 T-フラスコに播種し、上記DNA溶液を用い L-929細胞ヘリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。G 418 耐性細胞を選択した結果、耐性株10株を得た。本株を用い、2回の限界希釈法を用いた細胞のクローニ化を行い、エリスロポエチニを恒常的に生産する細胞株を樹立し、L-929 SVhEP 002 と命名した。尚、本株のエリスロポエチニ生産量は、ラジオイムノアッセイ法及びマウス胎児肝細胞を用いた CFU-E 形成 in vitro バイオアッセイ法で調べた結果、先と同様に 100単位/ $10^6\ \text{cell/day}$ であつた。

実施例 3

無血清培地によるエリスロポエチニの生産

実施例 1において作成した L-929 SVhEP 001 $1.5 \times 10^7\text{cell}$ を 600cm^2 のセルフアクトリーシングルトレー(ヌンク社製)に播種し、血清を含む培地 $200\ \mu\text{l}$ (Eagle's MEM(Earle's salt) + 10%

PCS)中で1日培養した後、無血清培地に交換し、
3日間培養し、さらに無血清培地に交換し3日間
培養し、無血清培養上清をそれぞれ200mlを得た。

本培地中に含まれるエリスロポエチン活性をラ
ジオイムノアッセイ法で定量した結果12単位/ml
であつた。

出願人 雪印乳業株式会社

代理人 宮田広豊